

4/5/1

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009671693

WPI Acc No: 1993-365245/199346

XRAM Acc No: C93-161937

New polypeptide contg. heparin-binding domain - has intercellular
adhesion activity and cancer metastasis inhibiting activity

Patent Assignee: TAKARA SHUZO CO LTD (TAKI)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 5271291	A	19931019	JP 91238935	A	19910827	199346 B
JP 2729712	B2	19980318	JP 91238935	A	19910827	199816

Priority Applications (No Type Date): JP 91117886 A 19910423

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

JP 5271291 A 13 C07K-013/00

JP 2729712 B2 20 C07K-014/78 Previous Publ. patent JP 5271291

Abstract (Basic): JP 5271291 A

A functional polypeptide of the formula A-(B)m-(C)n (I): A = 278
amino acid polypeptide Seg. No. 1); B = polypeptide

Asn-Val-Ser-Pro-Pro-Arg-Ala- Arg-Val-Thr-Asp-Ala-Thr-Glu-
Thr-Thr-Ile-Thr-Ile-Ser-Trp -Arg- Thr-Lys-Thr-Glu-Thr-Ile-Thr
-Gly-Phe-Gln-Val-Asp-Ala-Val-Pro Ala-Ans-Gly-Gln-Thr-Ile-Gln
-Arg-Thr-Ile-Lys-Pro-Asp-Val -Arg-Ser-Tyr-Thr-Ile-Thr-Gly
-Leu-Gln-Pro-Gly-Thr-Asp-Tyr-Lys- Ile-Tyr-Leu-Tyr-Thr-Leu-Asn
-Asp-Asn-Ala-Arg-Ser-Ser-Pro-Val- Val-Ile-Asp-Ala-Ser-Thr.

C = polypeptide Ala-Ile-Asp -Ala-Pro-Ser-Asn-Leu-
Arg-Phe-Leu-Ala-Thr-Thr-Pro -Asn-Ser-Leu-Leu-Val-Ser-Trp-Gln-
Pro-Pro-Arg-Ala-Arg-Ile-Thr -Gly-Tyr-Ile-Ile-Lys-Tyr-Glu-Lys
-Pro-Gly-Ser-Pro-Pro-Arg-Glu -Val-Val-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Gly
-Val-Thr-Glu-Ala-Thr-Ile-Thr -Gly-Leu-Glu-Pro-Gly-Thr-Glu-Tyr
-Thr-Ile-Tyr-Val-Ile-Ala-Leu -Lys-Asn-Asn-Gln-Lys-Ser-Glu-Pro-
Leu-Ile-Gly-Arg-Lys-Lys-Thr.

m + n = 1 or 2 and a cancer metastasis inhibitor contg. the above
functional polypeptide.

USE/ADVANTAGE - The new low molecular polypeptide has both
intercellular adhesion activity and cancer metastasis inhibiting
activity. In an example, Heparin-combining domain from E coli
HB101/pHD101 was introduced to E coli BW313. A double-stranded DNA was
derived and digested by NcoI-BamHI to give 0.54 kb band. It was ligated
with NcoI-BamHI fragment of plasmid pTF7520 and introduced to E coli
HB101. A plasmid was extracted from it and named pCHU179. III-12 and
III-14 of H-271 was deleted from it to give pCHV89. pCHV90 was also
prep'd. Their intercellular adhesion activities, heparin-combining
activities and reactivities with monoclonal antibody against
heparin-combined domain were determined. Their doses inhibited lung
metastasis of melanoma in mouse.

Dwg. 0/0

Title Terms: NEW; POLYPEPTIDE; CONTAIN; HEPARIN; BIND; DOMAIN; ADHESIVE;
ACTIVE; CANCER; METASTASIS; INHIBIT; ACTIVE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-013/00; C07K-014/78

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; A61K-038/00;

C12N-001/21; C12N-015/09; C12N-015/62; C12N-015/70; C12P-021/02;

C12R-001-19

File Segment: CPI

特開平5-271291

(43) 公開日 平成5年(1993)10月19日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 13/00	Z N A	8619-4H		
A 6 1 K 37/02	A D S			
	A D U	8314-4C		
// C 1 2 N 15/62				
15/70				

審査請求 未請求 請求項の数2 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-238935	(71) 出願人	591038141 實酒造株式会社 京都府京都市伏見区竹中町609番地
(22) 出願日	平成3年(1991)8月27日	(72) 発明者	東 市郎 北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3番2号
(31) 優先権主張番号	特願平3-117886	(72) 発明者	済木 育夫 北海道札幌市厚別区厚別北3条5丁目12-6
(32) 優先日	平3(1991)4月23日	(72) 発明者	田口 由紀 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造株式会社中央研究所内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 中本 宏 (外2名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 機能性ポリペプチド

(57) 【要約】

【目的】 細胞接着活性とガン転移抑制活性を合せもつ新規な機能性ポリペプチドを提供する。

【構成】 一般式 (化1) : A - (B)_m - (C)_n。

(式中Aは、配列表の配列番号1で表されるポリペプチド、Bは、配列表の配列番号2で表されるポリペプチド、Cは、配列表の配列番号3で表されるポリペプチド、m、nは1又は0の数を示す。但しm、nの和は1以上である) で表される機能性ポリペプチド。フィブロネクテン由来のポリペプチドの結合等により製造される。大腸菌による発現も確認した。

【効果】 ガン転移抑制作用のほか、創傷部の組織の修復や、恒常性の維持に寄与する。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(化1)：

【化1】 A-(B)_n-(C)_m。

(式中Aは配列表の配列番号1で表されるポリペプチド、Bは配列表の配列番号2で表されるポリペプチド、Cは配列表の配列番号3で表されるポリペプチド、m、nはそれぞれ1又は0の数を示す。但しm、nの和は1以上である)で表されることを特徴とする機能性ポリペプチド。

【請求項2】 請求項1記載の機能性ポリペプチドを含有することを特徴とするガン転移抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規ポリペプチドに関し、更に詳しくは細胞接着活性とガン転移抑制活性の両活性を有する新規なポリペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】 フィブロネクチン(以下、FNと表示する)は、血管や細胞外マトリックスに存在する糖タンパク質で、多彩な機能を持つことが知られている(Annual Review of Biochemistry, 第57巻, 第375~413頁(1988))。天然のFNを創傷治癒、点眼薬等の医薬品や化粧品に利用する試みがなされているが、血液から採取するために、供給に制限があること、コスト高であること、また、病原性の細菌やウイルス等による汚染の可能性があること等の理由により、実用化されていない。FNにはヘパリンに結合する領域(ヘパリン結合ドメイン)が2ヶ所存在し、1ヶ所はN末端付近にあり、結合にCaイオンが必要であることが知られている。もう一方の領域はC末端付近にあり、この領域のヘパリンに対する結合活性は、前述の領域よりも強く、しかもCaイオンに影響されない。最近の研究からFNのヘパリン結合ドメインが、細胞接着ドメインと同様に線維芽細胞、内皮細胞、ある種のガン細胞等の接着、伸展、移動に重要な役割を果たしていることが次第に明らかとなってきた。FNのヘパリン結合ドメインは細胞の表面にあるプロテオグリカンに結合して、細胞と細胞外マトリックスとの相互作用を引起すことにより、細胞の接着、伸展、移動等に寄与すると考えられる。したがって、細胞接着ドメイン構造とヘパリン結合ドメイン構造の両構造を持つポリペプチドは、細胞と細胞外マトリックスの両方に結合して創傷部の組織の修復や、恒常性の維持に寄与し、医薬品としての用途が期待できる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは特開平2-311498号公報に記載のヒトFNの細胞接着ドメインと、ヘパリン結合ドメインが、直接又はリンカーペプチドを介して結合した機能性ポリペプチドを創製し、該ポリペプチドがガン転移抑制作用等の生理活性を示す

2

ことを既に見出している(特開平3-127742号、特願平1-306145号、同2-165727号各明細書)。ガン転移抑制作用、脈管形成抑制作用等の生理活性は、機能性ポリペプチドの構造、特に該ポリペプチドのヘパリン結合ドメイン由来のポリペプチドの構造により異なることより、更にヘパリン結合ドメイン由来のポリペプチド部の構造の異なる上記機能性ポリペプチドの開発が望まれている。本発明の目的は上記現状にかんがみ、ヘパリン結合ドメイン由来のポリペプチド部の構造の異なる細胞接着活性とガン転移抑制活性を合せもつ機能性ポリペプチド、及び該ポリペプチドを含有するガン転移抑制剤を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は機能性ポリペプチドに関し、下記一般式(化1)：

【化1】 A-(B)_n-(C)_m。

(式中Aは配列表の配列番号1で表されるポリペプチド、Bは配列表の配列番号2で表されるポリペプチド、Cは配列表の配列番号3で表されるポリペプチド、m、nはそれぞれ1又は0の数を示す。但しm、nの和は1以上である)で表されることを特徴とする。また本発明の第2の発明はガン転移抑制剤に関し、本発明の第1の発明の機能性ポリペプチドを含有することを特徴とする。

【0005】 配列表の配列番号1のアミノ酸番号1~277はヒトFNの細胞接着ドメインのPro¹²³³-Ser¹³¹³と同一配列であり、配列表の配列番号2はヒトFNのヘパリン結合ドメインのAsn⁷⁸²-Thr¹⁸⁷⁹と同一配列であり、配列表の配列番号3は同じくヘパリン結合ドメインのAla⁸⁷¹-Thr⁹⁸⁰と同一配列である。

【0006】 なお、本明細書において、アミノ酸に付与された肩数字は、EMBLデータベース(EMBL DATA BANK)のFNのcDNAを翻訳して得られるアミノ酸に付与されたN末端からのアミノ酸残基数を示す。

【0007】 ヒトFNの遺伝子構造については、ジエンボジャーナル(The EMBO Journal)、第4巻、第1755~1759頁(1985)に記載されている。また、その細胞接着ドメイン及びヘパリン結合ドメインをコードするcDNAクローン(pLF5、pLF3、pLF4及びpLF5)についてはバイオケミストリー(Biochemistry)、第25巻、第4936~4941頁(1986)に記載されている。本発明者らは、pLF5から、細胞接着ドメインに対するcDNA断片を取出し、これを発現ベクターに接続して大腸菌に導入することにより、細胞接着活性ポリペプチド及びその製造方法を開発し特許出願した(特開平1-206998号)。本発明で必要とされる細胞接着ドメインのcDNAは、特開平1-206998号公報に記載されている組換え体プラスミドpTF7021を用いることができる。pTF7021

3

はFNの Pro¹²³⁹ - Met¹²¹⁷ (279アミノ酸残基)を発現するプラスミドである。pTF7021の糖鎖領域のC末端の終止コドンの直前にクローニングサイト、例えばNco Iサイトを導入することにより、細胞接着ドメインのcDNAと他のドメインのcDNAを連結させることができる。特開平2-311498号公報に記載のようにpTF7021にNco Iサイトを導入したプラスミドはpTF7520と命名され、該プラスミド中に Pro¹²³⁹ - Ser¹²¹⁸ - Metの配列がコードされている。

【0008】ヘパリン結合ドメインについてはトリプシン、サーモリシン、カテプシンD等によって分解されて得られた断片が報告されており、その大きさは、29 kDaから38 kDaに及んでいる。ドメインの詳しい特定はなされていないが、一般的には約90アミノ酸から成るI II型類似配列を3個(III-12、III-13、III-14)と、それに続くIIIC型配列の一部を含む断片が知られている。

【0009】ヘパリン結合ドメインをコードするcDNA Aは、pLF2435から取出すことができる。pLF2435は、前記pLF2、pLF3、pLF4及びpLF5から再構築されたプラスミドで、FNのヘパリン結合ドメインをコードするcDNAを含んでいる。pLF2435から必要なcDNA断片を制限酵素で切出し、5'側に開始コドンを含む合成DNAを、また、3'側には、終止コドンを含む合成DNAをDNAリガーゼで連結した後、適当な発現ベクターに接続することにより、特開平2-311498号公報に記載のIII型類似配列が3個つらなった配列を有するペプチド(H-271)を発現するプラスミドpBD101を得ることができる。

【0010】プラスミドpTF7520及びプラスミドpBD101については特開平2-311498号公報中に更に詳細に記述されている。CHV-179、CHV-90及びCHV-89は、それぞれヘパリン結合ドメインのIII型リピートのうち、III-13及びIII-14、III-14、及びIII-13が細胞接着ドメインポリペプチド(Pro¹²³⁹ - Ser¹²¹⁸)のC末端にメチオニン残基を介して結合したポリペプチドである。これらが発現するプラスミドは、例えば次のようにして構築することができる。ヘパリン結合ドメインのポリペプチド(H-271)をコードするプラスミドpBD101のIII-13のN末端、又はC末端に対応する領域にNco Iサイトを導入し、Nco IとBam HIで消化してIII-14、又はIII-13及びIII-14をコードするDNA断片を得る。これを細胞接着ドメインポリペプチドをコードしているプラスミドpTF7520(特開平2-311498号)のNco I-Bam HIサイトに接続することにより、CHV-179及びCHV-90をそれぞれ発現するプラスミドpCHV179及びpCHV90が得られる。次いで、CHV-179を発現するプラスミドから、部位特異的変異の手法で、III-14をコードする配列を欠失させることによ

4

り、CHV-89を発現するプラスミドpCHV89を得ることができる。

【0011】前記プラスミドにおける連結部には、Nco Iサイトに由来するメチオニン残基がリンカーとして含まれる。リンカーの有無は、本発明の効果を左右するものではないが、必要とあれば部位特異的変異の手法により、容易に除去することができる。また、任意のスペーサーを分子間距離の調節のため挿入することもできる。

【0012】配列表の配列番号4のアミノ酸配列をコードするプラスミドpCHV89、配列表の配列番号5のアミノ酸配列をコードするプラスミドpCHV179、配列表の配列番号6のアミノ酸配列をコードするプラスミドpCHV90をそれぞれ例えば、大腸菌に導入し、適当な条件下に培養することにより、目的ペプチドが大腸菌内に蓄積される。発現の確認にはイムノブロットングが用いられる。組織大腸菌の全菌体タンパク質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分離した後、泳動パターンをニトロセルロース膜に移し取る。FNの細胞接着ドメインを認識するモノクローナル抗体(FN-10、宝酒造)、及びFNのヘパリンドメインを認識するモノクローナル抗体(IST-1又はIST-2、セラ・ラブ社)等を用いて検出されるバンドが目的のポリペプチドである。目的ポリペプチドの精製は、例えば次のように行う。組織大腸菌をL-ブロス等の培地に培養し、集菌した後、超音波処理により、菌体破砕液を得、これを遠心分離して上清を得る。上清を透析後、DEAEイオン交換体のカラムで分画し、次いで抗体カラム及び/又はヘパリン-アガロース等のアフィニティクロマトを行う。以上の操作により、目的のポリペプチドを精製することができる。

【0013】得られたポリペプチドは、BHKやNRK細胞に対する細胞伸張活性の測定及びヘパリン結合活性の測定に用いられる。細胞伸張活性の測定は、例えばルオスラチ(Ruoslahti)らの方法(Methods in Enzymology)、第2巻、第803-831頁(1981)に準じて行う。すなわち、試料をコートした後、BSAでブロッキングしたマイクロタイタープレートに、BHK又はNRK細胞の懸濁液を添加し、37℃で約1時間インキュベートした後、未吸着の細胞を洗浄した後、ホルマリン固定して、伸展した細胞の割合を顕微鏡下に測定することにより、細胞伸張の強さを測定することができる。一方、ヘパリン結合活性は、ヘパリンを結合した担体、例えばAF-ヘパリントヨパール(Toyopearl, 東ソー)のカラムに試料を吸着させ、NaClの塩濃度を上昇させて溶出させ、溶出された塩濃度により、ヘパリンへの結合能力を示すことができる。

【0014】以上の測定により、本発明のポリペプチドはBHKやNRK細胞に対して強い細胞伸張活性を示すと共に、CHV-179、CHV-89はそれぞれヘパ

5

リンに対しても強い親和性を示すことが証明される。

【0015】本発明のポリペプチドを医薬品として使用する場合は、必要に応じて医薬用担体と共に常法により製剤化し、経口投与又は非経口投与すればよい。賦形剤あるいは担体としては薬理学的に許容されるものが選ばれ、その種類及び組成は投与経路や投与方法によって異なる。例えば液状担体として水、アルコール類若しくは大豆油、オリーブ油、ミネラル油等の動植物油、又は合成油が用いられる。固形担体としてマルトース、シュクロースなどの糖類、アミノ酸類、ヒドロキシプロピルセルロースなどのセルロース誘導体、ステアリン酸マグネシウムなどの有機酸塩などが使用される。

【0016】注射剤の場合は溶解液は生理食塩液、各種緩衝液、グルコース、イノシトール、マンニトール、ラクトースなどの糖類溶液、エチレングリコール、ポリエチレングリコールなどのグリコール類が望ましい。またイノシトール、マンニトール、ラクトース、シュクロース等の糖類、フェニルアラニン等のアミノ酸等の賦形剤と共に凍結乾燥製剤とし、それを投与時に注射用の適当な溶剤、例えば滅菌水、生理食塩液、ブドウ糖液、電解質溶液、アミノ酸溶液等静脈投与用液体に溶解させて投与することもできる。製剤中における本発明のポリペプチドの含量は製剤により異なるが、通常0.1~100重量%好ましくは1~98重量%である。例えば注射液の場合には、通常0.1~30重量%、好ましくは1~10重量%の有効成分を含むようにすることが望ましい。経口投与する場合には前記固形担体若しくは液状担体と共に、錠剤、カプセル剤、粉剤、顆粒剤、液剤、ドライシロップ剤等の形態で用いられる。カプセル、顆粒、粉剤は一般に5~100重量%、好ましくは25~98重量%の有効成分を含む。

【0017】投与量は、患者の年齢、体重、症状、治療目的等により決定されるが治療量は一般に、非経口投与で1~100mg/kg/日、経口投与で5~500mg/kg/日である。

【0018】本発明のポリペプチドはB16メラーマを用いる転移のモデル系にて有意な転移抑制効果を示すもので、胃がん、肺がん、大腸がん、乳がん、前立腺がん、子宮頸がん、腎がんなどがん細胞に対して良好に転移を防止せしめる有用なものである。

【0019】以上詳細に説明した様に、遺伝子工学的手法により、細胞接着活性とがん転移抑制剤活性を併せ持ち、新規な機能性ポリペプチドを効率よく提供することができる。該ポリペプチドは抗転移抑制剤としての用途のほか、脈管形成抑制剤、創傷治癒剤、生長促進剤等の医薬品として、また、化粧料、培養基材等として有用である。

【0020】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

6

【0021】実施例1

ヘパリン結合ドメインの一部と細胞接着ドメインポリペプチドとの融合タンパク質の構築

なお、図1は融合タンパク質を発現するプラスミドの構築工程を示す図である。Escherichia coli HB 101/pBD 101 (FERM BP-2264)より調製したヘパリン結合ドメインをコードするプラスミドpBD101 (特開平2-311498号)を大腸菌BW313に導入し、ヘルパーファージM13K7を感染させてdUを含む一本鎖DNAを調製した。これをテンプレートとし、Nco I認識配列を含む互配列の配列番号6で表す合成DNAをプライマーとして、T4 DNAポリメラーゼを用いて、相補鎖合成を行った。なお、プライマーは、ポリヌクレオチドキナーゼにより、あらかじめ5'末端をリン酸化した。得られた2重鎖DNAを大腸菌DNAリガーゼで環状化し、宿主菌の大腸菌BHE71-18mut5株に導入して、複製させた。得られた形質転換体からプラスミドを抽出し、Nco Iで切断してゲル電気泳動で約0.27kbのバンドを与えるプラスミドを選択した。このようにして、ヘ

パリン結合ドメインのIII-13のN末端(Asn⁷⁸²)と、III-12のC末端(Glu⁷⁸¹)をコードする配列の間にNco Iサイトを導入したプラスミドを得た。なお、この変異導入には市販の変異導入キット(ミュータンK、宝酒造)を用いた。このプラスミドを、Nco IとBam HIで消化してゲル電気泳動を行い、約0.54kbのバンドをゲルから抽出した。一方、Escherichia coli JM 109/pTF 7021 (FERM BP-1941)より前述の組換え体プラスミドpTF 7021を調製し、次いで該プラスミドにNco Iサイトを導入した。Nco Iサイトの導入は特開平2-311498号公報に記載の通りに、配列表の配列番号7で表すオリゴヌクレオチドを合成し、前出ミュータンKを用いて行い、プラスミドpTF 7520を得た。前記0.54kbのDNA断片をNco IとBam HIで消化したpTF 7520とT4 DNAリガーゼで連結した後、大腸菌HB 101に導入した。得られた形質転換体から、プラスミドを抽出し、Nco Iと、Bam HIで消化したときに、0.54kbのバンドを与えるプラスミドを選択した。このプラスミドをpCEV179と命名した。pCEV179は、H-271のIII-12を欠失したヘパリン結合ドメインポリペプチドと細胞接着ドメインポリペプチド(Pro²³⁹⁹-Ser¹³²⁸)がメチオニン残基を介して結合した融合タンパク質を発現するプラスミドであることをDNAの塩基配列分析によって確認した。pCEV179を導入した大腸菌HB 101をEscherichia coli HB 101/pCEV179と命名、表示して工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した(微工研菌寄第12183号(FERM P-12183))。

【0022】同様にして、Nco Iサイトを含む互配列の配列番号8で表す変異導入プライマーを用いて、pBD101に変異導入を行い、III-13のC末端(Thr¹⁸⁷⁰)と

7

III-14のN末端 (Ala^{171}) をコードする配列の間にNco Iサイトを導入したプラスミドを得た。これをNco IとBam HIで消化して約0.27 kbのバンドを切り出し、pTF7520のNco I-Bam HIサイトに接続して、大腸菌HB101に導入した。得られた形質転換体から、プラスミドを抽出し、Nco IとBam HIで消化したとき0.27 kbのバンドを与えるプラスミドを選択し、このプラスミドをpCHV90と命名した。pCHV90は、H-271のIII-12とIII-13を欠失したヘパリン結合ドメインポリペプチドを細胞接着ドメインポリペプチドがメチオニン残基を介して結合した融合タンパク質を発現するプラスミドであることをDNAの塩基配列分析により確認した。pCHV90を導入した大腸菌HB101を*Escherichia coli* HB101/pCHV90と命名した。

【0023】次いで、pCHV179から、III-14をコードする領域を欠失するために欠失導入プライマーとしてIII-13のC末端をコードする配列に相補的な配列と、ストップコドン以下の配列に相補的な配列とが直接結合した配列表の配列番号9で表す30塩基のオリゴヌクレオチドを合成した。これをプライマーとして前記の方法で相補鎖を合成し、DNAリガーゼで閉環した後、大腸菌DH5 α 71-18mu ISを形質転換し、得られたプラスミドをNco IとBam HIで消化して、0.27 kbの断片を生成するものを目的の変異体として選択した。最終的には、塩基配列分析により、変異を確認した。このようにして得られたプラスミドはH-271のIII-12とIII-14を欠失したヘパリン結合ドメインポリペプチドと細胞接着ドメインポリペプチドがメチオニン残基を介して結合した融合タンパク質を発現するプラスミドであり、該プラスミドをpCHV89と命名した。これを再び大腸菌HB101に導入して、得られた形質転換体を*Escherichia coli* HB101/pCHV89と命名、表示して工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した〔微生物寄第12182号 (FERM P-12182)〕。

【0024】実施例2

CHV-89、CHV-90、及びCHV-179の大腸菌による生産と精製
pCHV89を導入した*Escherichia coli* HB101/pCHV89 (FERM P-12182) を50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む5mlのL-プロス培地に接種し、37℃、1夜振とう培養した。これを500mlの同培地に接種して振とう培養し、660nmの吸光度が0.3のときに、2mMのIPTGを添加して、更に20時間培養した。次に遠心分離により集菌し、1mM EDTA、5mMメルカプトエタノール、3 μM p-アミノフェニルメタンホルニルフロライドを含む20mMトリス塩酸バッファー (pH 8.0) に懸濁した。これを超音波処理した後、遠心分離を行って25mlの上清を得た。上清をDEAE-イオン交換 650M (15ml) をカラム

8

に吸着させ、目的物を20mMトリス塩酸バッファー (pH 8.0) で洗浄後、バッファー中のNaCl濃度の上昇により吸着物を分画した。イムノブロッティングにより検出された目的成分を集め、20mMトリス塩酸バッファー (pH 8.0) で平衡化した抗体カラム (FN-10を結合させたセファロース4B、10ml) に吸着させ、次に0.1M NaClを含む同バッファー、20mM酢酸アンモニウムの順に洗浄した後、40mM酢酸で目的成分を溶出した。その中でSDS-PAGEで単一のバンドを与える画分を集めて、脱塩、凍結乾燥した。このようにして500mlの培養菌体から約5mgのCHV-89を得た。このCHV-89の一部をプロテインシーケンサー (477A/120A、アプライドバイオシステム社) で分析して、N末端配列を確認した。また、カルボキシペプチダーゼP消化法により、C末端アミノ酸を確認した。

【0025】同様の方法により、pCHV179を導入した*Escherichia coli* HB101/pCHV179 (FERM P-12183) を培養し、500mlの培養菌体から、約5mgのCHV-179を得た。また、pCHV90を導入した*Escherichia coli* HB101/pCHV90の500ml培養液から約4mgのCHV-90を得た。CHV-179、CHV-90のN末端アミノ酸、C末端アミノ酸も、上記と同様の方法でそれぞれ確認した。

【0026】実施例3

生物活性の測定

前記実施例2で得られた各ポリペプチドを用いて細胞接着活性、ヘパリン結合活性及びヘパリン結合ドメインに対するモノクローナル抗体との反応性を測定した。細胞接着活性は、オルスラチアの方法〔メソッド イン エンザイモロジー、第82巻、該803~831頁 (1981)〕に準じて測定した。試料を蒸留水、PBS (リン酸緩衝生理食塩水) 等に溶かし、96穴マイクロプレート上で段階的に希釈した。4℃、2時間インキュベートして、試料をプレート上に吸着させた (50 μl /ウェル)。3% BSA (牛血清アルブミン) を含むPBS溶液を100 μl /ウェルに加え、37℃、1時間インキュベートしてプレートをブロックした。PBSでプレートを洗浄後、あらかじめダルベッコ (Dulbecco's) イーグル最小栄養培地 (DMEM) に5 $\times 10^5$ 細胞/mlとなるように懸濁させたベビーハムスター腎細胞 (BHK-21) を100 μl /ウェル分注し、37℃、1時間インキュベートした。なお使用したBHK-21細胞は、凍結保存した株を継代培養後、トリプシン処理 (37℃、5分) したものをを用いた。PBSでプレートを洗浄後、3%ホルマリン溶液で細胞をプレート上に固定した。顕微鏡下でBHK-21細胞の伸展を観察し、伸展細胞数が、n-FNの高濃度における伸展細胞数の50%となる試料の濃度 (ED $_{50}$) を求め細胞接着活性の指標とした。

【0027】ヘパリン結合活性の測定は以下のようにした。20mMリン酸バッファー (pH 7.0) で平衡化したAFヘパリンートヨパール650Mのカラム(1.5ml)に試料を乗せ、バッファー中のNaCl濃度を段階的に上昇させ、溶出される塩濃度によりヘパリンへの結合力を表した。

【0028】ヘパリン結合ドメインに対するモノクローナル抗体との反応性の測定は、試料1~2μgをSDS-PAGEで分離し、これをセミドライプロッター(ザルトリウス社)を用いて、ニトロセルロース膜にブロッティングした。膜をブロッキング液(1%BSAを含むPBS)で処理した後、FNのヘパリン結合ドメインを認識するモノクローナル抗体(1ST-1及び2、セラ・ラブ社)を含むブロッキング液と約1時間インキュベートし、50mM NaCl及び*

*0.05% NP-40を含む10mMトリス・HClバッファー (pH 7.5) で膜を洗浄し、更にNP-40を含まない上記バッファーで膜を洗浄した。次いで、パーオキシダーゼ標識2次抗体(アマシャム社)を含むブロッキング液と約1時間インキュベートし、同様に膜を洗浄した。4-クロロ-1-ナフトール及びH₂O₂を含む50mM NaCl-トリス・HCl (pH 7.5) 溶液に膜を浸して、膜にブロッティングされたバンドを発色させた。

【0029】以上のようにして得られた測定結果を表1に示す。なお、特開平2-311498号公報記載のC₂₇₇-Met-H₂₇₁を対照として用いた。

【0030】

【表1】

表 1

試 料	細胞接着活性 (ED ₅₀ , nM)	ヘパリン結合活性 (溶出塩濃度, mM)	抗体との反応性	
			1ST-1	1ST-2
C ₂₇₇ -Met-H ₂₇₁	176	300	有	有
CHV-179	176	300	有	有
CHV-90	176	150	無	無
CHV-89	176	300	有	有

【0031】実施例4

次に本発明のポリペプチドの生理活性を示す。

(1) ガン転移抑制作用

C57BL/6 マウス (1群5匹) にB16-BL6 メラノーマ細胞 3×10⁴ 個と本発明のポリペプチド1000μgを静脈内に注入する(細胞とポリペプチドをPBS中で混合し、その0.05mlを静注する)。対照としてメラノ*

※メラノーマ細胞のみを静注し、対照群とする。メラノーマ細胞移植後14日目に肺を摘出して、肺表面における転移結節数を顕微鏡を用いて測定する。その結果を表2に示す。

【0032】

【表2】

表 2

	投与量 μg/マウス	肺への転移数 平均±SD
対 照	—	45±7
CHV-89	1000	12±9
CHV-90	1000	11±5
CHV-179	1000	4±3

【0033】以上のように、本発明のポリペプチド投与群で、メラノーマの肺転移が抑制されている。

【0034】(2) 急性毒性試験

C57BL/6 マウスにCHV-89、CHV-90、CHV-179をそれぞれ静脈内投与した。100mg/kgにおいて毒性は認められなかった。

【0035】実施例5

次に、本発明のポリペプチドの製剤例を示す。なお各例において、部は重量部を意味する。

【0036】製剤例1

CHV-89 30部に対しPBSを加え、全量を2000部としてこれを溶解後、ミリポアフィルターGSタイプを用いて除菌ろ過する。このろ液2gを10mlのバイアル瓶にとり凍結乾燥し、1バイアルに該ポリペ

11

チド30mgを含む凍結乾燥注射剤を得た。

【0037】製剤例2

CHV-90 30部に対しPBSを加え、全量を2000部としてこれを溶解後、ミリポアフィルター-GSタイプを用いて除菌ろ過する。このろ液2gを10mlのバイアル瓶にとり凍結乾燥し、1バイアルに該ポリペプチド30mgを含む凍結乾燥注射剤を得た。

【0038】製剤例3

CHV-179 30部に対しPBSを加え、全量を2000部としてこれを溶解後、ミリポアフィルター-GSタイプを用いて除菌ろ過する。このろ液2gを10mlのバイアル瓶にとり凍結乾燥し、1バイアルに該ポリペプチド30mgを含む凍結乾燥注射剤を得た。

【0039】製剤例4

CHV-89 50部、乳糖600部、結晶セルロース330部及びヒドロキシプロピルセルロース20部をよく混和し、ロール型圧縮機（ローラーコンパクター）を用いて圧縮し、破砕して16〜60メッシュの間に入るように篩過し、顆粒とした。

【0040】製剤例5

CHV-90 50部、乳糖600部、結晶セルロース330部及びヒドロキシプロピルセルロース20部をよく混和し、ロール型圧縮機（ローラーコンパクター）を

配列：

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asu	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1				5					10					15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asu	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln	
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170					175					180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195

12

用いて圧縮し、破砕して16〜60メッシュの間に入るように篩過し、顆粒とした。

【0041】製剤例6

CHV-179 50部、乳糖600部、結晶セルロース330部及びヒドロキシプロピルセルロース20部をよく混和し、ロール型圧縮機（ローラーコンパクター）を用いて圧縮し、破砕して16〜60メッシュの間に入るように篩過し、顆粒とした。

【0042】

10 【発明の効果】本発明によりFNのヘパリン結合ドメイン由来のポリペプチド部の構造が異なり、細胞接着活性とガン転移抑制活性の両活性を合せ持つ新規低分子ポリペプチド及びその製造方法が提供される。このポリペプチドは遺伝子工学的に大量に供給可能であり、創傷治癒等種々の分野で有用な新規タンパク質である。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：278

配列の型：アミノ酸

20 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

13	14
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg	
200	205
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe	
215	220
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys	
230	235
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg	
245	250
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg	
260	265
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met	
275	

配列番号: 2

配列の長さ: 89

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

* トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント (ヒトフィブロネクチン)

*

配列:

Asn Val Ser Pro Pro Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

配列番号: 3

配列の長さ: 90

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

30※ トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント (ヒトフィブロネクチン)

※

配列:

Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro			
1	5	10	15
Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr			
	20	25	30
Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu			
	35	40	45
Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr			
	50	55	60
Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu			
	65	70	75
Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr			
	80	85	90

配列番号: 4

配列の長さ: 367

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

15		16
Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg		
1	5	10
Val Thr Trp Ala Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu		
	20	25
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu		
	35	40
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu		
	50	55
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Glu		
	65	70
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp		
	80	85
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe		
	95	100
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg		
	110	115
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp		
	125	130
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
	140	145
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
	155	160
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
	170	175
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
	185	190
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
	200	205
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
	215	220
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
	230	235
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
	245	250
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
	260	265
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg		
	275	280
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp		
	290	295
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val		
	305	310
Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp		
	320	325
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr		
	335	340
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro		
	350	355
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr		
	365	

配列番号: 5

配列の長さ: 467

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 1 本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg		
1	5	10 15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu		
20		25 30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Asp Val Ala Glu Leu		
35		40 45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu		
50		55 60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln		
65		70 75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp		
80		85 90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe		
95		100 105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg		
110		115 120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp		
125		130 135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
140		145 150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
155		160 165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170		175 180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185		190 195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200		205 210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215		220 225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230		235 240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245		250 255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260		265 270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg		
275		280 285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp		
290		295 300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val		
305		310 315
Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp		
320		325 330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr		
335		340 345

19		20
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro		
350	355	360
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu		
365	370	375
Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln		
380	385	390
Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys		
395	400	405
Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly		
410	415	420
Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr		
425	430	435
Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Gln Lys Ser Glu Pro		
440	445	450
Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr		
455		

配列番号: 6

配列の長さ: 368

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 1 本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg		
1	5	10
15		
Val Thr Trp Ala Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu		
20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu		
35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu		
50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln		
65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp		
80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe		
95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg		
110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp		
125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225

21		22
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn		
275	280	285
Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp		
290	295	300
Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu		
305	310	315
Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro		
320	325	330
Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu		
335	340	345
Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu		
350	355	360
Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr		
365		

配列番号: 7

配列の長さ: 26

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

ハイボセティカル配列: NO

アンチセンス: YES

配列の特徴: 1-26 E primer

配列:

GCTGACATTG GOCATGGCTC CAGAGT 26

配列番号: 8

配列の長さ: 22

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

ハイボセティカル配列: NO

アンチセンス: YES

配列の特徴: 1-22 E primer

配列:

CTATTACACC ATGGATGGTT TG 22

配列番号: 9

配列の長さ: 22

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

ハイボセティカル配列: NO

アンチセンス: YES

配列の特徴: 1-22 E primer

配列:

ATCAATGGCC ATGGTGGAGG CG 22

30 配列番号: 10

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

ハイボセティカル配列: NO

アンチセンス: YES

配列の特徴: 1-30 E primer

配列:

40 AGCCGGATCC TATTAACTGG AGGCGTCGAT 30

【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpCHV179、pCHV89、及びpCHV90をそれぞれ構築するための工程図である。

【手続補正書】

【提出日】平成4年1月27日

【手続補正2】

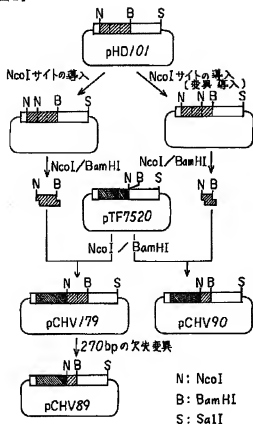
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】追加

【補正内容】

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

C 12 P 21/02

(C 12 P 21/02

C 12 R 1:19)

識別記号 片内整理番号

C 8214-4B

F I

技術表示箇所

(72)発明者 君塚 房夫

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造
株式会社中央研究所内

(72)発明者 加藤 郁之進

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造
株式会社中央研究所内